



TITLE:

Mechanism of the ECM stiffness-dependent differentiation of mesenchymal stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kuroda, Mito

CITATION:

Kuroda, Mito. Mechanism of the ECM stiffness-dependent differentiation of mesenchymal stem cells. 京都大学, 2018, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21159>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2018-08-01に公開

京都大学	博士 (農 学)	氏名	黒田 美都
論文題目	Mechanism of the ECM stiffness-dependent differentiation of mesenchymal stem cells (細胞外マトリックスの硬さに応じた間葉系幹細胞の分化調節機構)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>動物生体内に存在する間葉系幹細胞は、脂肪細胞や骨芽細胞へと分化する多能性をもつ。そのため間葉系幹細胞の分化を調節する仕組みの解明は、再生医療分野の発展だけでなく、メタボリックシンドロームやロコモティブシンドロームの予防に欠かせない。近年、間葉系幹細胞の分化は、細胞周囲をとりまくコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) の硬さによっても影響を受けることが明らかになった。例えば、軟らかいECM上に比べ硬いECM上では脂肪細胞への分化が抑制される。しかし、その分子メカニズムの詳細は不明であった。</p> <p>細胞は、ECMとの接触部位 (接着斑) にアクチン繊維を係留し、アクチン繊維がECMに伝える張力を利用して硬さを感知していると考えられている。これまでに、繊維芽細胞ではアクチン繊維と直接結合する接着斑タンパク質ビンキュリンがECMの硬さに応じてアクチン繊維高親和型へと構造変化すること、この構造変化には別の接着斑タンパク質ビネキシンα (SORBS3) とCAP (SORBS1) が必要であることが報告されている。そこで本研究では、ECMの硬さが間葉系幹細胞の分化を制御する際のビンキュリンおよびSORBSファミリータンパク質の役割について解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第一章では、ECMの硬さが間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を制御する際のビンキュリンの役割について解析した。まず間葉系幹細胞においてECMの硬さがビンキュリンの構造変化に与える影響を調べた。マウス間葉系幹細胞株ST2を硬さの異なるポリアクリルアミドゲル培養基板上に播種し、界面活性剤Triton X-100に対するビンキュリンの不溶性を指標にビンキュリンの構造変化を評価した。その結果、間葉系幹細胞においても硬いECM上ほどアクチン繊維高親和型のビンキュリンが増加することを明らかにした。最近、ECMが硬い時には転写因子YAP/TAZが核へ局在化し、脂肪細胞への分化を抑制することが報告されたことを受け、次にビンキュリンがYAP/TAZの核局在に与える効果について免疫染色法により調べた。野生型の細胞では、硬いECM上において軟らかいECM上に比べYAP/TAZの核局在が亢進した。一方、ビンキュリンの発現抑制細胞では、硬いECM上におけるYAP/TAZの核局在が低下していた。また、野生型ビンキュリンを発現させた場合YAP/TAZの核局在が亢進したが、アクチン繊維結合能が低下したビンキュリン変異体(I997A)を発現させた場合、その効果は小さかった。このことから、ビンキュリンはアクチン繊維との結合</p>			

を介して、硬いECM上でのYAP/TAZの核局在を促進していることが示された。次に、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化制御におけるビンキュリンの役割について調べた。野生型細胞では硬いECM上で脂肪細胞への分化が抑制されたのに対し、ビンキュリンの発現抑制細胞では硬いECM上でも軟らかいECM上と同程度に脂肪細胞への分化が進行した。またビンキュリンI997A変異体は野生型ビンキュリンに比べて、硬いECM上での脂肪細胞への分化抑制効果が減弱していた。これらの結果から、ビンキュリンはECMが硬いときに脂肪細胞への分化を抑制し、それにはアクチン繊維結合能が必要であることが明らかになった。さらにsiRNAによるYAP/TAZの発現抑制実験から、ビンキュリンの下流で、YAP/TAZが脂肪細胞への分化調節に関与していることを明らかにした。以上の結果より、「ビンキュリンはECMの硬さに応じてアクチン繊維高親和型へと構造変化し、それがYAP/TAZの核局在を介して、ECMの硬さに応じた間葉系幹細胞の分化制御を行っている」というモデルを提唱した。

第二章では、ECMの硬さが間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を制御する際のSORBSファミリータンパク質の役割について解析した。初めに、間葉系幹細胞内におけるビンキュリンのアクチン繊維高親和型への構造変化に、ビネキシンおよびCAPが与える影響を調べた。その結果、ビネキシンまたはCAPの発現を抑制した細胞では、いずれもアクチン繊維高親和型のビンキュリンが減少していることが示唆された。このことから、間葉系幹細胞においてビネキシンとCAPの両方の発現がビンキュリンのアクチン繊維高親和型への構造変化に必要なことが明らかになった。次に、ビネキシンおよびCAPがECMの硬さに応じたYAP/TAZの核局在に与える影響について検討し、ビネキシンおよびCAPの発現が硬いECM上でのYAP/TAZの核局在に必要であることを示した。さらに、ビネキシンおよびCAPが間葉系幹細胞の分化に与える影響を調べた。CAPはビンキュリン同様、YAP/TAZを介して間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進した。一方、予想に反して、ビネキシンはビンキュリンやCAPとは逆に、脂肪細胞への分化を促進し、骨芽細胞への分化を抑制した。このことから、CAPはビンキュリンとともにECMの硬さ感知に働き、YAP/TAZの核局在を介してECMの硬さに応じた間葉系幹細胞の分化制御を行っていることが明らかになった。これに対し、ビネキシンは、ECMの硬さによるYAP/TAZの核局在の調節には関与するものの、それとは別に間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を促進する機能をもつことが明らかになった。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

間葉系幹細胞の分化は液性因子だけでなく、細胞周囲をとりまくコラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) の硬さによっても影響を受ける。しかし、これまで間葉系幹細胞のECMの硬さによる分化制御の分子メカニズムは不明であった。本論文は、接着斑タンパク質であるビンキュリンおよびSORBSファミリータンパク質に焦点を当て、ECMの硬さに応じた間葉系幹細胞の分化制御における分子メカニズムを解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 間葉系幹細胞において、ビンキュリンは ECM の硬さによる調節を受け、硬い ECM 上でアクチン繊維高親和型への構造変化を促進することを明らかにした。
2. 硬い ECM 上におけるビンキュリンの構造変化は、転写因子 YAP/TAZ の核局在促進を引き起こし、それが硬い ECM 上での脂肪細胞への分化を抑制していることを見出した。
3. ビンキュリンの構造変化を引き起こす SORBS ファミリータンパク質、ビネキシン(SORBS3)およびCAP(SORBS1)は、ビンキュリンと同様に、ECM の硬さに応じて YAP/TAZ の核局在を調節することを明らかにした。
4. CAP は YAP/TAZ を介して硬い ECM 上での脂肪細胞への分化を抑制していることを明らかにした。一方で、ビネキシンは YAP/TAZ の核局在調節とは別に脂肪細胞への分化を促進する機能を持つことを見出した。

以上のように本論文は、細胞外マトリックスの硬さによる間葉系幹細胞の分化制御機構を明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および基礎生理学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)